

1 Einleitung

Arterien sind in der Lage, Gefäßweite und Strömungswiderstand in Abhängigkeit vom Sauerstoffbedarf des von ihnen versorgten Gewebes auf einer schnellen Zeitskala zu optimieren. Da die Sauerstoffextraktion des Gewebes nahezu konstant bleibt, muss hierzu die Sauerstoffversorgung verändert werden [181]. Zur Sicherung dieser Funktion dienen zum einen systemische Faktoren, zum anderen die Autoregulation des Gefäßes; beider Aufgabe ist es, unabhängig vom Perfusionsdruck einen näherungsweise konstanten Fluß zu gewährleisten. Der hierzu notwendige Tonus der glatten Gefäßmuskulatur wird über entgegengesetzt wirkende Mechanismen reguliert, von denen die wichtigsten in der myogenen Autoregulation (Bayliss-Effekt) [11] sowie der flußabhängigen Dilatation (Schretzenmayr-Effekt) [150] bestehen. Dem dilatierenden Moment der Gefäßregulation kommt dabei sowohl in physiologischen als auch pathologischen Reaktionsmustern die größere Bedeutung zu [130].

Entscheidend ist hier die Reaktion nicht nur auf die Größe der angreifenden Kräfte, sondern auch auf ihre mitunter minimalen zeitlichen und räumlichen Fluktuationen. Das zentrale Problem der Übersetzung von Flußgradienten innerhalb des Gefäßlumens auf die intrazelluläre Konzentrationsänderung von vasoaktiven Substanzen, also die Mechanosensorik oder Wahrnehmung des Flußreizes und die mechano-chemische Transduktion des Flußreizes durch die Zellmembran der Endothelzelle hindurch bis zum eigentlichen Effektor, der glatten Gefäßmuskelzelle, ist dabei unzureichend erklärt geblieben.

Diese Arbeit untersucht die Wirkung zweier funktioneller Kompartimente, die für diese Aufgaben der Mechanosensorik und -transduktion verantwortlich sind. Zum einen ist dies das Gefäßendothel, Sitz eines Transmembran-Proteoglycans, Syndecan, das vermittels seiner durch unterschiedliche Flußraten veränderten Konformation für die Rolle eines Mechanosensors in Frage kommt. Daneben wird die Bedeutung der subendothelialen bindegewebigen Matrix in ihrer Funktion als Mechanotransduktor untersucht. Schließlich wird der Anteil beider Kompartimente an der flußabhängigen Tonusentwicklung normaler und arteriosklerotischer humaner Koronararterien unter Flußraten, die entlang des physiologischen Spektrums der Flußverhältnisse *in situ* auftreten, beschrieben.

1.1 Geschichte

Bereits 1921 postulierte Thoma die Abhängigkeit der Gefäßwandbewegung von der Flußgeschwindigkeit des Blutes, die erstmals 1932 von Schretzenmayr an der Femoralarterie des Menschen nachgewiesen werden konnte [150]. Bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts hinein wurde als Erklärung das Konzept der ascendierenden Dilatation favorisiert, bei dem der Tonus der terminalen Arteriolen stromaufwärts übertragen wird [50,72]. Nach Greggs' Nachweis reaktiver Dilatation von Arterien auf lokalen Sauerstoffmangel kam eine Debatte über die myogene oder metabolische Vermittlung dieser Reaktion auf, die von Hintze und Vatner 1984 durch den Nachweis des rein lokalen Charakters einer durch Hypoxie provozierten reaktiven Dilatation an Hunde-Koronararterien entschieden werden konnte [73].

Auf die Rolle des Endothels an der Grenzfläche zwischen Flußgeschehen und Gefäßwand wies zuerst Robard 1975 hin mit der Annahme, daß Endothelzellen in der Lage seien, auf verschiedene Flußstärken unterschiedlich zu reagieren und somit Fluß zu „messen“. 1980 wurde sein Modell in Teilen durch Experimente an der Kaninchen-Carotis durch Kamiya bewiesen [89]. Im gleichen Jahr gelang Zawadski und Furchgott [54] die Darstellung der endothelabhängigen Gefäßdilatation, die sie durch einen Zufall entdeckten: Bei der Untersuchung der Reaktion von Gefäßstreifen auf steigende Acetylcholin-Konzentrationen gelangten sie zu dem Schluss, daß an den Streifen, die erst bei höheren ACh-Konzentrationen relaxierten, das Endothel vorher durch Reiben zerstört worden war. Sie konnten beweisen, daß die ACh-induzierte Relaxation endothelabhängig ist. Wie sie durch die „sandwich mount“-Methode - bei der die Relaxation von einem endothelhaltigen auf ein deendothelialisiertes Präparat übertragen werden konnte - darstellten, wird die Relaxation durch einen endothelialen Mediator vermittelt, den sie EDRF (endothelium-derived relaxing factor) nannten. Sieben Jahre später gelang Palmer und Ferrige der Beweis, daß NO einer von mehreren möglichen EDRF ist [126]; dies wurde fast zeitgleich durch Furchgott et al, Martin et al und Ignarro bestätigt [55,80,109].

1988 gelang Palmer der Nachweis der endothelständigen NO-Synthase (eNOS) [127]. 1992 wurde das Enzym von Nishida kloniert [120]; Uematsu erbrachte 1995 den Beweis, daß das Enzym unter laminarer Scherkraft vermehrt exprimiert wird [172]. Einige der dazu notwendigen Mechanismen, unter anderem die Steigerung der transkriptionalen Regulation und der posttranslationalen Modifikation, wurden von Gallis 1999 benannt [58]: Zum einen wird 30 Sekunden nach dem Einsetzen von laminarer Scherkraft das aktive Zentrum des

Enzyms reversibel phosphoryliert, zum anderen moduliert NO posttranslational die Induktion von Egr1, einem frühen Transkriptionsfaktor für die Synthese. Ab Mitte der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden bis zu 30 verschiedene scherkraftresponsive Elemente (shear stress responsive elements, SSREs) im eNOS-Genom entdeckt [63,129]. Die Intensivierung der Erforschung dieser Stimuli führte, zusammen mit der außerordentlichen Rolle, die der flußabhängigen Dilatation beim Verständnis der Vasomotorik arteriosklerotisch veränderter Gefäßabschnitte zukommt, dazu, daß Scherkraft zur Zeit den insgesamt beststudierten Stimulus für eine Genregulation darstellt [63]. Dabei lassen sich scherkraftabhängig zwei Gengruppen differenzieren: unter hoher Scherkraft von $>15 \text{ dyn/cm}^2$ werden neben dem eNOS-Genabschnitt u.a. Gene für antioxidativ wirkende Metaboliten vermehrt exprimiert, während Adhäsionsmoleküle, darunter VCAM-1, und das vasokonstriktorisch wirkende Endothelin vermindert exprimiert werden. Unter niedriger oder oszillatorischer Scherkraft wird Endothelin ebenso wie die prokoagulatorisch wirkenden Thrombozytenwachstumsfaktoren PDGF A und B vermehrt exprimiert [129].

Gerade aus der Vielzahl der durch unterschiedliche Flußmuster innerhalb z.T. sehr kurzer Zeitabschnitte induzierten Genregulationsfaktoren der endothelialen NO-Synthese läßt sich der Schluss ziehen, daß Endothelzellen in der Lage sind, auch sehr feine Unterschiede in zeitlichen und räumlichen Scherkraftgradienten wahrzunehmen und darauf mit einer Veränderung sowohl der Genexpression als auch der Zellmorphologie zu reagieren.¹

1.2 Fluß und Scherkraft - Begriffsbestimmung und Meßbereiche

Die Flußrate in humanen Koronararterien liegt unter Ruhebedingungen zwischen 3 ml/min (linke Koronararterie, frühsystolisch) und nahezu 150 ml/min (linke Koronararterie, frühdiastolisch) und hängt *in vivo*, neben dem rhythmisch pulsierenden Aortendruck, vor allem vom interstitiellen Myokarddruck ab [3,115]. An Gefäßwänden, insbesondere in den herznahen Koronarien, greifen zwei prinzipielle Kräfte an: einerseits pulsabhängiger Zug, eine entlang eines zur Fließrichtung senkrechten Vektors auftreffende Kraft, die vom arteriellen Blutdruck abhängt, andererseits die parallel zur Fließrichtung auftretende Scherkraft.

¹ 'The striking differences between the response of endothelial cells to physiological uniform laminar stress, versus spatial and temporal shear stress gradients, which are seen both in the morphology of the cells and in the patterns of gene expression, suggest that endothelial cells are capable of sensing different patterns of shear stress.' (Resnick 2000 114)

Blut ist eine Newtonsche Flüssigkeit, deren Viskosität η nach dem Newtonschen Reibungsgesetz abhängig ist von Scherkraft und Scherrate:

(Gleichung 1) $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$

mit τ = Scherkraft (Schubspannung, shear stress) und $\dot{\gamma}$ = Scherrate, wobei Scherkraft definiert ist als die tangential an der Gefäßwand ansetzende Kraft pro Flächeneinheit und die Scherrate einen Geschwindigkeitsgradienten zwischen Schichten einer sich bewegenden Flüssigkeit darstellt [76]. Im Bereich laminarer Strömung in großen geraden Arterien beträgt die Scherkraft 2-5 dyn/cm², im Bereich turbulenter Strömung wie in Gefäßverzweigungen 40-250 dyn/cm² [102], im Bereich arteriosklerosebedingter Stenosen bis zu 3349 dyn/cm² [164]. In mittelgroßen Arterien, zu denen die Koronararterien gehören, liegt die Scherkraft bei ca. 10-30 dyn/cm² [168,139]. Dies zeigt eine deutliche lokale Variabilität [132] und widerlegt die 1926 von Murray aufgestellte „minimal cost“-Hypothese [117], nach der die Scherkraft für alle Gefäßabschnitte gleich wäre.

1.2.1 Laminare Scherkraft

Laminare Scherkraft liegt in allen geraden Gefäßabschnitten des Kreislaufs vor und führt zu einem unter optimalen Bedingungen parabolischen Geschwindigkeitsprofil innerhalb des Gefäßlumens mit einer Minimierung und Konstanzhaltung der Scherkraft am Gefäßrand. Laminare Scherkraft induziert innerhalb von 30 Sekunden über eine reversible Phosphorylierung der endothelständigen NO-Synthase die Produktion von gefäßdilatierendem NO [58]. Sie bewirkt darüber hinaus an der Endothelzelle starke Veränderungen der Zellform, der Zellanordnung und der zytoskeletalen Architektur in Richtung eines zellulären „alignment“ [34] sowie schwächere Veränderungen der Membrandeformierbarkeit und der Zellteilungsrate [63]. Das Fehlen von laminarer Scherkraft führt zur Apoptose von Endothelzellen [44,88]. Laminare Scherkraft induziert außerdem selektiv die anhaltende Hochregulation der Gene für Mn-Superoxiddismutase und Cyclooxygenase 2 und wirkt dadurch antioxidativ, antithrombotisch und antiadhäsiv [63].

1.2.2 Turbulente Scherkraft

Turbulente Scherkraft tritt in Regionen mit erhöhtem Flußwiderstand wie Gefäßverzweigungen und gebogenen Gefäßabschnitten auf. Der Übergang von laminarer in

turbulente Strömung ist dabei abhängig von der Reynoldszahl Re , einem Maß aus Innendurchmesser des Gefäßes ($2 r_i$), der über den Querschnitt gemittelten Geschwindigkeit v sowie der Dichte ρ und der Viskosität η der Flüssigkeit entsprechend

(Gleichung 2)
$$Re = 2 r_i v (\rho/\eta).$$

Wenn die Reynolds-Zahl einen kritischen Wert von 2000-2200 überschreitet, geht die laminare in turbulente Strömung über. In stenosefreien Koronararterien liegt diese Zahl bei 500 bis 1000 [95], so daß hier von vorwiegend laminarem Fluß ausgegangen werden kann [160].

Turbulente Scherkraft hat keinen Effekt auf die Regulation von eNOS [119], Superoxiddismutase oder Cyclooxygenase 2 [63].

1.3 Wandaufbau humaner Koronararterien

Koronararterien verfügen über den für Arterien typischen Wandaufbau aus Intima mit einreihigem Endothel und einer gefensterten, elastischen Basalmembran, Media mit glatten Gefäßmuskelzellen, die von elastischen Lamellen und Kollagenfibrillen umgeben sind, sowie über Adventitia mit kollagen- und elastinreichem Bindegewebe, wenigen glatten Muskelzellen und sympathischen Nervenendigungen. Den Hauptanteil an der Gefäßwanddicke haben dabei Bindegewebe und die Zellen der glatten Muskulatur [76].

1.3.1 Endothel

1.3.1.1 Vorkommen, Aufbau, Funktion

Das Endothel besteht unter der Bedingung konstanten unidirektionalen laminaren Flußes aus länglichen, in Flußrichtung orientierten, kontaktinhibierten, flachen elliptischen oder polygonalen Zellen, die das gesamte Gefäßsystem auskleiden [125]. Aufgrund dieser Strecke und der starken parakrinen Aktivität ist es mit 1000 bis 1500 g Gesamtgewicht das größte endokrine Organ des Menschen [9]. An der entscheidenden Schnittstelle zwischen visköser zirkulierender Flüssigkeit und unterschiedlichen anliegenden Geweben erfüllt es eine Reihe von Aufgaben, deren wichtigste die Modulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur als

dem grundlegenden Regulationsprinzip des Kreislaufs darstellt [76]. Entscheidend ist daneben die Aufrechterhaltung einer in verschiedenen Kreislaufabschnitten unterschiedlich permeablen dynamischen Schrankenfunktion für Plasmamoleküle, die durch „tight junctions“ am luminalen Ende der Zell-Zell-Kontakte aufrecht erhalten und regional durch zusätzliche Bindegewebelemente unterstützt wird, beispielsweise durch Astrozyten, die im Zentralnervensystem die Blut-Hirn-Schrankenfunktion aufrechterhalten. Dieser Schrankensteht eine Transportfunktion vermittelt Fenestration und Pinozytose gegenüber; in entzündeten Geweben kommt es histaminvermittelt zur Retraktion der Endothelzellränder und zur Extravasation von Serum und aktivierten neutrophilen Granulozyten. Eine dritte wichtige Funktion ist die antikoagulatorische Auskleidung der Gefäße durch Freisetzung von Prostaglandinen (insbesondere PGI₂) und NO, das luminal die Thrombozytenaggregation und die Expression von Adhäsionsmolekülen hemmt, sowie die Bereitstellung von Bindungsstellen für Inhibitoren der Gerinnungskaskade. Die teilweise Aufhebung der beiden letzteren Funktionen spielt in der Initialphase der Arterioskleroseentstehung eine entscheidende Rolle. Das oben erwähnte inflammatorische Ödem wird ebenfalls in der Anfangsphase der Entstehung arteriosklerotischer Plaques gefunden. Die teilweise Freilegung ungeschützter glatter Muskelzellen durch Retraktion der Endothelzellen gilt dabei als Primärreiz für die Aktivierung von Gerinnungskaskaden, die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten und die Ausbildung wandständiger thrombotischer Plaques [162].

1.3.1.2 Oberflächenphänomene unter Fluß

Endothelzellen sind flache Zellen mit einer deutlichen Erhebung auf Höhe des Zellkerns, die zu einer linearen Zunahme der Scherkraft um bis zu 36% führt. Barbee konnte zeigen, daß bei Zunahme der Flußgeschwindigkeit eine Abflachung der Kernregion unter Verringerung der maximalen Steilheit von 11° auf 8° erfolgt, die eine Verringerung des Scherkraft-Spitzengradienten um 0,25 dyn/cm² oder 50% [7] und insgesamt eine Verkleinerung des scherkraftexponierten Areals nach sich zieht [8]. Zusätzlich wirkt sich die Richtung und Gerichtetheit der Scherkraft auf die Orientierung von Zelle und Zellkern aus („alignment“): in Regionen mit turbulenter Scherkraft liegen Zellen mit weniger orientierten und kürzeren Kernen vor [34,49]. *In vitro*-Studien über die Flußverhältnisse in der Nähe von Strömungshindernissen wie Gefäßaufzweigungen zeigten unter turbulenter Scherkraft eine Flußabwärtsmigration und eine geringere Zelldichte der Endothelzellen sowie eine bis zu 10fach erhöhte Zellteilungsrate [34,42].

Die genannten Phänomene weisen auf eine Übersetzung des Flußreizes auf sowohl an der Plasma- als auch an der Kernmembran ansetzende Fasern hin, die für die Aufrechterhaltung der Zellform und der Anhaftung an die Basalmembran zuständig sind.

1.3.2 Extrazelluläre Matrix

1.3.2.1 Bindegewebelemente: Vorkommen und Funktion

Die subendotheliale extrazelluläre Matrix der Gefäßwand besteht aus zwei miteinander verknüpften Elementen:

- der subendothelialen Basalmembran, die von Kollagenen, Elastin- und Lamininfasern sowie Proteoglycanen stabilisiert wird, und
- Aktin- und Myosinfasern.

Zwischen diesen formgebenden und -erhaltenden Fasern und in Interaktion mit ihnen finden sich Strukturglykoproteine wie Laminin und Fibronectin [100] sowie die Proteoglycane der Grundsubstanz. Letztere sind aufgrund der hohen Versatilität ihrer Glycosaminoglycan-Seitenketten mittels verschiedener Sulfatierungs- und Carboxylierungsmuster in der Lage, sich durch gewebsspezifische Expression an unterschiedlichste biologische Bedürfnisse anzupassen [27,30]. Zu den Proteoglycanen in der Gefäßwand gehören Perlecan mit einem hohen Anteil an Disulfidbrücken, Versican und die Syndecan-Superfamilie. Diese Polymere sind stark hygroskop und regulieren darüber den Wassergehalt des Gewebes. Sie funktionieren in ihrer Eigenschaft als Polyelektrolyt in Zell- und Basalmembran als Ionenaustauscher mit Einfluß auf Membranpotential und transmembranalen Ionentransport und garantieren durch die Einbindung von Ca^{2+} -Ionen (Gelatinisierung) hohen Druckwiderstand [30,154].

Zusätzlich finden sich spezialisierte Fasern in den Transmembranverbindungen zwischen Zytoskelett und Basalmembran, den sogenannten Haftplatten (focal adhesions). Diese sind besonders reich an Vinculinfasern, die über Bindung mit den Aktinfasern des Zytoskeletts eine Verbindung zwischen Plasma- und Basalmembran schaffen [21,22]. In einer Echtzeit-Aufzeichnung der Vorgänge an Haftplatten mittels „tandem scanning confocal image analysis“ konnte Davies 1993 ein ständiges spontanes intensives Ummodellieren im Bereich der Haftplatten ungestörter Zellen sowie die Auflösung der Haftplatten und Ablösung der Endothelzellen nach Zugabe von hochkonzentriertem Trypsin zeigen [37]. Haftplatten sind besonders reich an Integrinen, einer großen Familie heterodimer Glykoproteinrezeptoren, die an die jeweilige RGD(Arg-Gly-Asp)-Sequenz von Aktin-, Fibronectin-, Talin-, Vinculin- und

Lamininfasern der Plasmamembran binden und so als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle dienen [110,144]. Haftplatten weisen eine hohe Dichte an den Integrinrezeptoren $\alpha_v\beta_3$ (Fibronectin- und Lamininrezeptoren), $\alpha_2\beta_1$ (Lamininrezeptoren), $\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptoren) und $\alpha_5\beta_1$ (Fibronectinrezeptoren) auf, also an Rezeptoren mit nahezu singulärer Ligandenspezifität [1,20,79,152]. Die in der NO-Signaltransduktion wichtigen Tyrosinkinasen FAK, Rho A, JNK und die Serinkinasen ERK1 und ERK2 stellen ebenfalls Liganden dar, die nach Bindung zu einer Konzentration von Integrinen an der Haftplatte führen [106,112]. Zur Aktivierung der Integrine ist eine Phosphorylierung von Tyrosin- oder Serinresten der zytoplasmatischen Anteile notwendig, die durch die Bindung des jeweiligen Liganden ausgelöst wird; dabei führt die Phosphorylierung von β_2 -Integrinen zur homophilen Adhäsion, von β_1 -Integrinen jedoch zur Reduzierung von Fibronectin- und Talinbindungen und damit zur Abrundung und Ablösung der Zellen [154].

1.3.2.2 Verhalten unter Fluß

Die Hauptaufgabe der extrazellulären Matrix der Gefäßwand ist die Aufrechterhaltung des elastischen Moments der Gefäßwand unter physiologischen Flußbedingungen, wobei die Verstärkung des Rückstellmoments unter hohem Fluß von entscheidender Bedeutung ist [71]. Daneben kommt der extrazellulären Matrix, u.a. den Wandproteinen Elastin und Typ-IV-Kollagen, insbesondere von herznahen Arterien wie Koronarien die Aufgabe zu, den frühsystolisch verstärkten „circular strain“ aufzufangen. Durch diesen Mechanismus wird auch unter Bedingungen pulsatilen Flußes auf Höhe des Endothels das Optimum laminaren Flußes erreicht [102] sowie die Schwelle erhöht, oberhalb derer die Scherkraft strukturelle Veränderungen des Endothels hervorrufen kann [103].

Zur Erfüllung dieser Aufgaben ist einerseits die Aufrechterhaltung der Zell-Zell- und der Zell-Basalmembran-Kontakte, andererseits die Etablierung eines Spannungsäquilibrium der Zellwand vonnöten. Mehrere Experimente gaben Hinweise auf die dazu notwendigen Mechanismen. Unter laminarer Scherkraft in der Größe von 30 dyn/cm^2 wird eine Vermehrung und Umfangzunahme von Fibronectin- und Lamininfasern sowie die Zunahme von Vinculin- und Talinfasern und $\alpha_5\beta_1$ -Rezeptoren in den Haftplatten kultivierter Endothelzellen gesehen [166,167]. In einem richtungsweisenden Experiment banden Wang und Butler 1993 RGD-gespickte Mikroperlen an die β_1 -Untereinheit von Integrinen in der Zellmembran kultivierter Endothelzellen, deren Beweglichkeit sie anschließend mit einem Magnetsystem testeten [179]. Die über dieses System angreifenden Kräfte variierten sie über ein Spektrum, das einer Scherkraft von $0-68 \text{ dyn/cm}^2$ entsprach. Je höher die angreifenden

Kräfte, desto weniger beweglich waren die Mikroperlen. Hieraus entwickelten die Autoren das Modell der „tensegrity“ (tensional integrity), also der Festigkeit unter Zug, als der Hauptaufgabe der extrazellulären Matrix endothelialer Zellen unter Flußbedingungen.

1.3.3 Endotheliale Proteoglycane als Fluß-Sensoren

Ausgehend von der Beobachtung, daß das Ausmaß flußabhängiger Gefäßdilatation durch die Senkung der extrazellulären Na^+ -Konzentration abgeschwächt wird, wies Bevan 1991 auf die Rolle von luminalen endothelständigen Proteoglycanen bei der Umsetzung des Scherreizes durch die Endothelzellmembran hindurch hin. Diese ergibt sich aus zwei einzigartigen Eigenschaften dieser großen Moleküle[14]: zum einen aus ihrer Rolle als Polyelektrolyt mit starker Negativladung und einer Vielzahl von Bindungsstellen für Kationen, insbesondere Na^+ und Ca^{2+} , zum anderen aus den besonderen viskoelastischen Eigenschaften insbesondere der Glycosaminoglycan-Seitenketten, die eine scherkraftabhängige Konformationsänderung eingehen können. Ein mehrfach durch $^{23}\text{Na}^+$ -Magnetresonanzspektroskopie untersuchtes Modell belegt, daß die Seitenketten des unter ‘no flow’-Bedingungen in Zufallskonformation vorliegenden, durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Moleküls unter Flußbedingungen zu in Flußrichtung liegenden Helices ausgerichtet werden [153,155,157]. Diese Konformationsänderung bewirkt das Freiwerden von zusätzlichen Na^+ -Bindungsstellen, die Migration der Ionen entlang der Seitenkette und schließlich den vermehrten Einstrom von Na^+ in die Endothelzelle.

Von der Vielzahl der untersuchten luminalen Proteoglycane kommt Syndecan eine Schlüsselfunktion beim ‘outside-in signaling’ zwischen Flußgeschehen und Zytoskelett zu, einem in 4 Subtypen vorliegenden integralen Membranprotein mit hoch konservierten sulfatierten und N-acetylierten extrazellulären Domänen sowie stark variierenden Chondroitin- und Heparansulfatseitenketten [28,140]. Das Molekül besitzt eine extrazelluläre, unmittelbar in Membrannähe gelegene dibasische Sequenz, über die die Ektodomäne durch Trypsin und andere Proteinasen abgespalten werden kann, sowie 3 zytoplasmatische Tyrosinresiduen, die von Tyrosinkinase angesteuert werden [108,147]. Während die Heparansulfat- und Chondroitinsulfatseitenketten eine hohe Ligandenspezifität haben (u.a. für Zytokine wie bFGF, aFGF, GM-CSF, IL-3 und $\text{IF}\gamma$) und abhängig von der jeweiligen biologischen Aufgabe exprimiert werden [93,145], ist die zytoplasmatische Domäne hoch konserviert [68,90,158]. Diese interagiert mit dem aktinhaltigen Zytoskelett und nimmt darüber Einfluß auf Formation und Umbau der Haftplatten [96]. Untersuchungen durch Rapraeger 1986 zeigten eine Sequestrierung von Syndecan und anderen Proteoglycanen an

der basolateralen Zelloberfläche nach Aktivierung durch Matrixbestandteile [134]. Zusätzlich dient Syndecan als ein Korezeptor für Integrine bei der intrazellulären Signaltransduktion [68]. Siegel etablierte anhand von Untersuchungen über das Yayo-Modell das Konzept des 'mechanischen Synzytiums' zwischen Zytoskelettbestandteilen und Syndecan [154].

1.4 Mechanismen der Vasomotorik

Zur Kurzzeitoptimierung der Sauerstoffversorgung einer Körperregion stehen verschiedene Mechanismen mit Auswirkung auf den Gefäßtonus zur Verfügung. Im Bereich der Koronararterien vermittelt dabei eine lokale Hyperoxie über einen reduzierten 5HT-Metabolismus einen verstärkten koronaren Widerstand, eine Hypoxie über verstärkte Prostacyclin- und NO-Freisetzung eine endothelabhängige Dilatation [9].

1.4.1 Vasokonstriktion

In Ruhe werden Querschnitt und Strömungswiderstand peripherer Arterien zunächst von der Spontanaktivität vasokonstriktiver Fasern der glatten Gefäßmuskulatur bestimmt. Der leicht kontrahierte Ruhetonus setzt sich aus einem durch lokale Einflüsse hervorgerufenen Basaltonus sowie der Wirkung sympathisch-adrenerger Neurone zusammen. Nimmt diese ab, ist eine passive Vasodilatation die Folge. Dabei ist das vasodilatatorische Potential umso größer, je höher der Basaltonus ist.

1.4.1.1 Neurogene Vasokonstriktion

Alle arteriellen Gefäße werden von an der Grenze zwischen Adventitia und Media endenden postganglionären sympathischen Fasern innerviert, deren terminale Endigungen zahlreiche Varikositäten aufweisen. Gewebsabhängig werden aus diesen unterschiedliche Konzentrationen an vasokonstriktorisches Substanzen freigesetzt, unter denen Noradrenalin - neben ATP und Neuropeptid Y - die größte funktionelle Bedeutung hat. Freigesetztes Noradrenalin löst über purinerge Rezeptoren an der Plasmamembran glatter Gefäßmuskelzellen schnelle, transiente Depolarisationen und damit eine Zunahme des Muskeltonus aus.

1.4.1.2 Myogene Autoregulation (Bayliss-Effekt)

Blutgefäße reagieren auf eine transmurale Druckerhöhung mit Konstriktion und auf eine Druckreduktion mit Dilatation [41]. Dieser Effekt, der insbesondere bei Arteriolen, aber auch

in größeren Arterien, Venulen, Venen und Lymphgefäßen auftritt, wurde 1902 von Bayliss die „myogene Antwort“ (myogenic response) genannt; er griff damit auf Beobachtungen zurück, die Jones bereits im Jahr 1852, Ostroumoff 1868 und Gaskell 1881 gemacht hatten [11,59,87,124]. Nachdem Anrep 1917 argumentiert hatte, daß diese Phänomene auf metabolische Faktoren zurückzuführen seien, wurde erst 1949 mit dem Nachweis druckabhängiger Vasomotorik denervierter Gefäßabschnitte durch Folkow die von lokalen Metaboliten unabhängige, eigentliche Autoregulation von Gefäßen in Abhängigkeit vom Umgebungsdruck etabliert [52]. In Folge wurde der Begriff Bayliss-Effekt ausschließlich für den konstriktorischen Effekt verwendet, den erhöhter arterieller Druck auf die glatte Gefäßmuskulatur von Arterien und Arteriolen hat [47].

1.4.1.3 Endothelabhängige Vasokonstriktion

Zur Gruppe endogener, vom Endothel produzierter Vasokonstriktoren gehören die 1988 entdeckten Peptide der Endothelin-Familie [128]. Sie wirken unter Beteiligung einer Proteinkinase C schon in picomolaren Konzentrationen über eine Depolarisation der glatten Gefäßmuskulatur vasokonstriktorisch [45]. Das aktivste Endothelin ist Endothelin-1, das 1988 von Yanagisawa kloniert wurde [182]. Unter laminarer Scherkraft sind mRNA-Konzentration und Freisetzung von Endothelin vermindert, wobei unter geringen Flußraten auch eine vorübergehende erhöhte Freisetzung gesehen wird [107]. Eine erhöhte Endothelin-Ausschüttung wird ebenfalls in einer Reihe klinischer Zustände mit lokaler Endothelschädigung wie Arteriosklerose, kardiogenem Schock, pulmonalem Hochdruck, akutem Nierenversagen und Subarachnoidalblutung gesehen [105,174]. Die Freisetzung von Endothelin-1 wird durch endotheliales NO, aber auch durch exogene Zufuhr oraler Nitrate gehemmt [17,119].

1.4.2 Flußabhängige Vasodilatation

1.4.2.1 Endothelvermittelte flußabhängige Vasodilatation

Arterien und Arteriolen jeden Kalibers sowie Venen dilatieren unter zunehmender lokaler Flußrate. Das Ausmaß dieser Dilatation ist von der „shear responsiveness“ der Gefäßwand abhängig [76]. Die Vasodilatation ist dabei immer der Nettoeffekt von myogener Antwort (Bayliss-Effekt, s.o.), der Wirkung von vasoaktiven systemischen Metaboliten und ihren Antagonisten sowie der endothelabhängigen Reaktion auf die lokal vorliegende Scherkraft. Bei mittelgroßen und kleinen Arterien wie Koronarien ist die Wirkung von Neurotransmittern

vernachlässigbar; hier spielt die scherkraftabhängige endotheliale NO-Freisetzung eine übergeordnete Rolle im Sinne eines koordinativen Elements [3].

NO wird von der endothelialen NO-Synthase, einem membranständigen, konstitutiv exprimierten Enzym, das aus der Guanidinogruppe von L-Arginin freies NO abspaltet, in zwei Phasen produziert: Bei Einsetzen des Flußreizes erfolgt ein initialer schneller Anstieg, dessen Höhe zunächst einmal unabhängig von der Größe der ansetzenden Scherkraft ist. Bei anhaltendem Fluß folgt dann eine zweite plateauförmige Produktionsphase, in der die Konzentration des produzierten NO direkt abhängig vom Ausmaß der Scherkraft ist. In weitergehenden Versuchen wurde die Calcium-/Calmodulinabhängigkeit der ersten Phase nachgewiesen [51]. Die zweite Phase ist dagegen calciumunabhängig und beinhaltet die Aktivierung eines Na^+/H^+ -Ionenaustauschers sowie die reversible Phosphorylierung des aktiven Zentrums der eNOS durch Proteinkinase C und verschiedene Tyrosinkinasen [5,32,39]. Aufgrund des biphasischen Aktivierungsmusters wird bereits bei niedrigen Flüssen durch eine kontinuierliche basale NO-Freisetzung die sympathisch-adrenerg vermittelte Konstriktion zum großen Teil aufgehoben.

Eine Reihe von Faktoren aktiviert eNOS über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Endothelzellen [10]. Auslöser sind einerseits neben den genannten physikalischen Stimuli Scherkraft (als Primärstimulus, v.a. wenn chronisch) [76] und Abfall des Sauerstoffpartialdrucks unter 50 mmHg [181] sowie einem niedrigen pH-Wert [5] auch mechanische Deformation und Pulsation, andererseits eine Reihe von rezeptorvermittelt wirkenden Agonisten, u.a. ACh, ATP [15,46,113], ADP, Histamin, Bradykinin, Oxytocin, Serotonin, Noradrenalin [23], Thrombin, Lysophosphatidylcholin [70], Vasopressin, NF- β [74], Substanz P [133], Östrogen [76] und calcitonin gene-related peptide sowie cGMP-Analoga [69] und Wachstumsfaktoren wie PDGF [78,107].

NO ist ein hochdiffusibles Gas, das nach luminal und durch die Basalmembran hindurch in die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur diffundiert. In letzteren bewirkt NO über eine Bindung an das zweiwertige Eisen der hämhaltigen Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase eine Konformationsänderung des benachbarten katalytischen Zentrums und damit scherkraftabhängig eine Steigerung der Konversionsrate $\text{GTP} \rightarrow \text{cGMP}$ [121]. cGMP aktiviert über eine Phosphorylierung der Calcium-ATPase eine vermehrte Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien der glatten Muskelzelle und, über eine sinkende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die Relaxation der Muskelzelle und die Dilatation des Gefäßabschnitts [56].

Eine weitere NO-Wirkung besteht in der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit P_{open} Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle der glatten Gefäßmuskulatur. Über einen K-Efflux aus der Muskelzelle kommt es zur Hyperpolarisation und damit zu Relaxation und Vasodilatation [16].

1984 wies Griffith in Donor-Detector-Versuchen mit variablen Transitstrecken und –zeiten eine extrem kurze Halbwertszeit von 6,3 s für EDRF nach [66]; diese Kalkulation wurde 1988 durch Bassenge kritisiert, der unter Annahme einer Exponentialfunktion für das Verhältnis von EDRF-Konzentration und mechanischer Antwort aus einer sigmoidalen Dosis-Effekt-Kurve eine HWZ von 74 s kalkulierte [2,9].

Alternative EDRF-Kandidaten wie Bradykinin und EDHF führen lediglich in vitro zu einer Hyperpolarisation und Relaxation glatter Gefäßmuskulatur; Wasserstoffperoxid scheint in Situationen, in denen die Metabolisierung von Arginin eingeschränkt ist, ein alternatives Substrat für die endothelständige NO-Synthase darzustellen [29]. In Versuchen, die den Effekt NO-unabhängiger Relaxation durch Bradykinin, Substanz P und Calcimycin untersuchten, wurde dargestellt, daß eine durch diese Stoffe vermittelte Hyperpolarisation lediglich 60-80% der durch NO erreichbaren Relaxation auslöste [92].

Ein weiteres NO-unabhängig relaxierendes Molekül ist PGI_2 (Prostacyclin), das scherkraftabhängig von der endothelialen Cyclooxygenase aus Arachidonsäure abgespalten wird und über die Aktivierung der glattmuskulären Adenylatcyclase die Umsatzrate $\text{ATP} \rightarrow \text{cAMP}$ erhöht und darüber eine Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und resultierende Relaxation der glatten Muskelzelle bewirkt [53,65,75]. Ebenfalls über eine Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. EDHF ist ein bisher unidentifiziert gebliebener Faktor, der durch eine endotheliale Epoxygenase calmodulinabhängig aus Arachidonsäure abgespalten wird und ebenfalls über eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von hyperpolarisierenden glattmuskulären K^+ -Kanälen (speziesabhängig entweder K_{Ca} oder K_{ATP}) wirkt [18,29,173]. Beide Stoffe, PGI_2 und EDHF, sind potente Vasodilatoren, die 2 Minuten nach Einsetzen der Scherkraft einen Spitzenspiegel aufweisen, um anschließend abzunehmen. Hierbei ändert sich, im Gegensatz zu NO, das Integral ihrer Konzentration über die Zeit nicht, was ein Adaptationsphänomen nahelegt [65].

1.4.2.2 Matrixvermittelte flußabhängige Vasodilatation

1988 wies Bevan erstmals die flußabhängige Dilatation einer pharmakologisch vorkontrahierten mittelgroßen Kaninchenarterie nach, die nach mechanischer Entfernung des Endothels in geringerem Ausmaß persistierte [12]. Der Autor machte für diese Restdilatation

bindegewebige „stress fibers“ der Subintima verantwortlich, die nach Entfernung des Endothels der direkten Einwirkung der Scherkraft ausgesetzt waren. Die Tatsache, daß die deendothelialisierten Gefäße sich nicht durch Acetylcholin dilatieren ließen, führte er auf das Fehlen muskarinergere Rezeptoren in der Subintima zurück. Ähnliche Beobachtungen wurden an Hirnarterien [61] sowie an Koronararterien des Schweins gemacht [62]. Auch Vequaud sah an der Ratten-Koronararterie auch nach Entfernung des Endothels eine deutliche flußabhängige Dilatation von bis zu 40% des Ausgangstonus, wenn das Präparat sehr hoher Scherkraft von über 150 dyn/cm^2 ausgesetzt war [175,176].

Inzwischen konnten verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix identifiziert werden, die als Vermittler und Modulatoren der flußabhängigen Vasodilatation fungieren. Insbesondere Laminin sowie verschiedene Integrine, die von den oben erwähnten Tyrosin- und Serinkinasen angesteuert werden, aktivieren scherkraftabhängig die endotheliale NO-Synthase. Die Blockade eines lamininbindenden Proteins setzt die flußabhängige endotheliale NO-Produktion stark herab [64]. Nach Blockierung von Integrinen über ihre RGD-Bindungsstellen ist die flußabhängige NO-Produktion der Endothelzellen sowie die resultierende Vasodilatation um 89% vermindert [115].

Aus der darüberhinaus möglich gewordenen Analyse von unter Flußbedingungen vermehrt exprimierten Enzymen und vermehrt aktivierten biochemischen Kaskaden läßt sich zusätzlich die Rolle matrixständiger Tyrosin- und Serinkinasen identifizieren, die durch die entscheidenden Signalwege bei der Umsetzung des Scherreizes in eine vermehrte endotheliale NO-Produktion angesteuert werden [138]:

- 1) die Aktivierung von Tyrosinkinasen wie PDGF [85,36], *c-scr* [84], FAK und Fyn, zwei an Haftplatten lokalisierten Enzymen [38], sowie von dem VEGF-Rezeptor Flk1, dessen Aktivierung zu einer Bindung von Shc führt, das ebenfalls ein Substrat für $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an Haftplatten ist [24]; anschließend
- 2) die Aktivierung von Serinkinasen wie den mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1, 2 und 5 mit einem Spitzenumsatz 10 Minuten nach Einsetzen des Flußreizes und JNK und p38 mit einem Spitzenumsatz nach 30 min [151]. Die genannten Kinasen werden am stärksten durch turbulente Scherkraft aktiviert; die Aktivierung ist von G-Proteinen und Proteinkinase C, aber nicht von der Calciumkonzentration abhängig [82,171].

Beide Signalwege weisen zahlreiche wechselseitige Verstärkungen und Abschwächungen auf [138]. Indem der endothelial wahrgenommene Flußreiz zu einer Aktivierung matrixständiger

Kinasen führt, über die wiederum die Aktivität der endothelialen NO-Synthase moduliert wird, stellt dieses System gleichzeitig den Ort der Endothel-Matrix-Interaktion sowie der Mechanotransduktion des Flußreizes dar.

Neben der Rolle der Matrix bei der kurzfristigen Tonusmodulation in Abhängigkeit von der Scherkraft ist die Matrix für die trophische Plastizität der Gefäßwand verantwortlich, also die Veränderung der Wandzusammensetzung und –elastizität auf einer langsamen Zeitskala. Chronisch erhöhter laminarer Fluß führt über die Hochregulation von Wachstumsfaktoren wie PDGF- β und TGF- β durch NO und Prostacyclin zur Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und zur allmählichen Erweiterung des Gefäßes. In zahlreichen Versuchen wurde dieser Zusammenhang insbesondere für epikardiale Koronararterien bewiesen; die Remodellierbarkeit dieser Gefäße ist für die positive Wirkung von regelmäßiger moderater körperlicher Belastung auf den Durchmesser der koronaren Gefäßwand und des freien Lumens verantwortlich [119].

Aus der bisherigen Darstellung ergeben sich also drei Aufgaben der extrazellulären Matrix arterieller Gefäßwände: die Aufrechterhaltung der Integrität des Endothelzellverbands, die Modulation des von Proteoglycanen der luminalen Endothelzellmembran übermittelten Scherreizes in eine vasomotorische Antwort sowie die trophische Plastizität des Gefäßes unter chronisch veränderten Flußbedingungen.

1.5 Desiderate

1) Die in der vorausgehenden Übersicht genannten Arbeiten fallen methodisch in zwei Bereiche: auf der einen Seite *in vitro*-Studien an kultivierten Endothelzelllinien oder isolierten Tierpräparaten, auf der anderen Seite *in vivo*-Studien an Tieren oder Menschen ohne genaue Zuordnung der Ergebnisse zu gemessenen Fluß- und Scherkraftraten. Flußversuche am intakten humanen Gefäßpräparat sind bisher nicht veröffentlicht worden.

2) Obwohl Einzelversuche den Einfluß von Substanzen mit zytoskelettstabilisierender oder –disruptiver Wirkung auf die intrazelluläre cGMP-Produktion nachweisen konnten [98], fehlen Versuche am intakten Endothel-Matrix-Verband. Die methodische Konzentration auf endotheliale Zellkulturen läßt keine Möglichkeit, den Effekt der gesamten extrazellulären Matrix zu kontrollieren.

3) Eine Differenzierung der Anteile von Endothel und Matrix an der flußabhängigen Dilatation ist lediglich für Einzelaspekte wie die MAP-Kinasen-Aktivierung [83] oder die

Wirkung der Blockierung von Proteoglycanen und Integrinen [143] unternommen worden. Eine Zuordnung zu dem resultierenden Phänomen Tonusentwicklung fehlt.

4) Mit Ausnahme der Arbeiten von Resnick 1995 [137] und Ziegler 1996 [189] gibt es kaum Versuche in „unsteady flow systems“, die eine zeitliche und/ oder räumliche Variierung des Flußes zulassen.

5) Zusammenfassend fehlt eine systematische vergleichende Untersuchung des Beitrags von Endothel und Matrix zu Membranpotential- und Tonusentwicklung in Abhängigkeit von systematisch variierten Flußraten in normalen und arteriosklerotischen Gefäßen unter jeweils identischen Versuchsbedingungen.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung zweier distinkter funktioneller Kompartimente in der Gefäßwand humaner Koronararterien in ihrer Reaktion auf im physiologischen Bereich variierte Flußverhältnisse: einerseits das Endothel mit einem luminalen Transmembran-Proteoglycan als Mechanosensor, andererseits die bindegewebige Matrix, die die Endothelzellen untereinander und mit der Basalmembran verbindet, als Mechanotransduktor. Zur Ermittlung der Anteile des jeweiligen Kompartiments an der Nettokraftentwicklung normaler und arteriosklerotischer Gefäße wurde ein Auswertungsmodell entwickelt, das in Abschnitt 2.7.1 näher erläutert wird. Zur Darstellung des Gesamteffekts von Sensor und Matrix wurden Membranpotential und Tonus unbehandelter Gefäßabschnitte mit denen trypsinisierter Präparate unter steigenden Flußraten zwischen 3 ml/min und 100 ml/min verglichen. Zur Darstellung des Effekts des endothelständigen Sensors wurden Membranpotential und Tonus unbehandelter Koronarpräparate mit denen deendothelialisierter Präparate verglichen. Die Differenz zwischen dem Gesamt- und dem Sensoreffekt wurde als Matrixeffekt interpretiert. Alle drei Teilanalysen wurden sowohl an normalen als auch an arteriosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten durchgeführt.